



TITLE:

Phenotype-Based High-Throughput
Classification of Long QT Syndrome
Subtypes Using Human Induced Pluripotent
Stem Cells(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Yoshinaga, Daisuke

CITATION:

Yoshinaga, Daisuke. Phenotype-Based High-Throughput Classification of Long QT Syndrome Subtypes Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. 京都大学, 2020, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2020-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k22335>

RIGHT:

京都大学	博士（医学）	氏 名	吉 永 大 介
論文題目	Phenotype-Based High-Throughput Classification of Long QT Syndrome Subtypes Using Human Induced Pluripotent Stem Cells （ヒト人工多能性幹細胞を利用した、QT 延長症候群の表現型に基づくハイスループット判別法）		
（論文内容の要旨）			
<p>QT 延長症候群（LQTS）は常染色体優性遺伝形式をとる遺伝性不整脈疾患で、体表心電図上の QT 時間延長を特徴とし、致死的不整脈である多型性頻拍発作の原因となる。頻度は約 2000～3000 人に 1 人とされているが、浸透率の低さや表現度の違いから、疾患の重症度は幅広い。</p> <p>診断は通常、心電図上の QT 時間からなされるが、QT 時間や心電図波形のみからは治療方針や生活指導に役立つ LQTS のサブタイプ（型）分類は困難である。現在のところ LQTS の型は責任遺伝子によって 16 に分類されているが、それぞれの遺伝子異常が、心筋細胞の活動電位形成に関わるイオンチャネル（I_{Na}, I_{Ca,L}, I_{Kr}, I_{Ks}, I_{K1}）のいずれかの機能異常を引き起こすとされている。遺伝子検査も診断上有用ではあるが、遺伝子変異の検出率は 60-70%程度で、遺伝子変異の未検出例も多い。近年、ゲノム解析技術の進歩に伴い数多くの遺伝子変異の同定が可能になったが、同定された変異の病的意義が不明である場合が少なくない。</p> <p>この問題に関して、人工多能性幹細胞（iPS 細胞）由来分化心筋（iPSC-CMs）が患者の表現型を模倣しうることを利用して、遺伝子型に依ることなく細胞レベルでの異常電流を検出することで LQTS のサブタイプを判別する簡便な方法の開発を目指した。具体的には、ある電流を特異的に阻害することで、その反応性の違いから異常電流をもつ疾患特異的 iPSC-CMs が判別可能であるかについて検討した。</p> <p>LQT1 患者 1 名（<i>KCNQ1</i> p.A344Aspl）、LQT2 患者 2 名（<i>KCNH2</i> p.A422T および <i>KCNH2</i> p.G601S）、LQT3 患者 1 名（<i>SCN5A</i> p.N406K）の計 4 名より樹立した疾患特異的 iPS 細胞を使用した。その分化心筋に対して、特異的チャネル阻害薬を投与し、multi-electrode array システム上で心電図上 QT 時間に相当する、心筋細胞の field potential duration（FPD）を測定した。その上で、拍動間隔で補正した、corrected FPD（FPDc）を算出して、その変化率を検討した。なお、LQT1 および LQT2 はそれぞれ <i>KCNQ1</i>、<i>KCNH2</i> の機能喪失型変異による I_{Ks}、I_{Kr}の減少、LQT3 は <i>SCN5A</i> の機能獲得型変異による I_{Na}遅延電流の増加により QT 延長を呈することから、LQT1 および LQT2 では I_{Ks}/I_{Kr}ブロックによる FPDc の変化率は小さく、LQT3 では I_{Na}ブロックによる FPDc の変化率が大きいという仮説をたてて検証した。</p> <p>LQT2^{A422T}-および LQT2^{G601S}-iPSC-CMs における特異的 I_{Kr}阻害薬（E4031）に対する FPDc 延長率はコントロールや LQT1-iPSC-CMs と比較して有意に乏しかった。また、LQT2^{A422T}分化心筋の遺伝子修復により特異的 I_{Kr}阻害薬に対する FPDc 延長率は正常化した。この結果が I_{Kr}の電流量を反映していることを証明するために、パッチクランプ法で I_{Kr}電流量を確認したところ、FPDc 延長率と同様の傾向を示した。また、活動電位時間の変化率も同様の傾向を示した。さらに、同手法が他の遺伝子型にも適用しうることを確認するため、LQT1^{A344Aspl}-iPSC-CMs に対して特異的 I_{Ks}チャネル阻害薬（chromanol 293B）を投与したところ、コントロールや LQT2⁻、LQT3-iPSC-CMs と比較して FPDc 延長率が小さかった。また、LQT3^{N406K}-iPSC-CMs に対しては、特異的 I_{Na}阻害薬</p>			

(tetrodotoxin) 投与で、他と比較して大きな FPDc 短縮率を示し、遺伝子修復により反応性が正常化することが示された。それぞれの FPDc 変化率の診断検査としての有用性を検討するために ROC 解析を施行した。Area under curve は、LQT1^{A344Aspl}、LQT2^{A422T}、LQT2^{G601S}、LQT3^{N406K}でそれぞれ 0.83、0.98、0.93、0.87 であり、高い診断能を有すると考えられた。

本手法により、少なくとも LQTS の約 90%を占める 1 型、2 型、3 型を高精度で判別できることが示された。細胞レベルでの電流異常から病原性の有無やタイプ分類が可能であることが示唆され、遺伝子検査の欠点を補完する診断検査法となりえるとともに、患者の治療方針や生活指導に役立つ可能性がある。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、確定診断が困難な QT 延長症候群において、患者由来疾患 iPS 細胞由来分化心筋細胞を利用し、表現型を基にした確定診断かつサブタイプ分類が可能であることを示したものであり、遺伝子型と表現型のミスマッチが多くみられる QT 延長症候群において、遺伝子検査の弱点を補完しうる点で意義深い。

また、本手法の主となる電気生理学的評価法として従来のパッチクランプ法ではなく、より簡便で迅速な multi-electrode array システムを用いたという点においても今後の臨床応用を見据えた意義深い研究と考える。

しかしながら、本論文で使用した iPS 細胞株は数少ないことや薬剤負荷に対する反応性の評価法など改善すべき課題も残されている。本研究を基にして、臨床応用に向けたさらなる発展的研究が望まれる。

本研究が示した、iPS 細胞を利用した臨床診断への応用の可能性は、QT 延長症候群にとどまらず、他のイオンチャネル病にも応用できる可能性がある。

以上の研究は、iPS 細胞を利用した QT 延長症候群の新たなサブタイプ判別法の可能性を示し、遺伝性不整脈診断の発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（ 医学 ）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和 2 年 1 月 1 5 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。